

전핵 미세 주입법으로 생산된 한국흑염소 수정란의 이식 조건이 수태율에 미치는 영향

최윤석 · 신현국 · 장성근 · 양홍석 · 이육근 · 이두수¹ · 조종기 · 신상태[†]
충남대학교 수의과대학 · 동물의학연구소

Factors Affecting Pregnancy Rates on Transfer of Pronuclear Microinjected Embryos in Korean Black Goats

Y. S. Choi, H. G. Shin, S. K. Jang, H. S. Yang, O. K. Lee, D. S. Lee¹, J. K. Cho and S. T. Shin[†]
College of Veterinary Medicine · Research Institute of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was investigated factors affecting the pregnancy rates after transfer of pronuclear microinjected embryos for the production of transgenic Korean black goats. Embryo transfer was carried out in 343 recipient Korean black goats from September 1999 to June 2000. Estrus was induced by the insertion of intravaginal progesterone devices CIDR[®] for 2 weeks. A single injection of 400 IU equine chorionic gonadotropin was administered at 48 h before CIDR[®] removal to increase the proportion of does cycling and ovulation rate. Good quality embryos were prepared by microinjection of DNA into the pronuclei of fertilized goat oocyte and cultured *in vitro*. Pronuclear microinjected 1~8 cell stage embryos were surgically transferred into the oviducts of the recipient at day 4 or 5 following CIDR[®] removal, and morula to blastocyst stage embryos were surgically transferred into uterus at day 9. Pregnancy was diagnosed by transrectal ultrasound scanning at 20~30 d and 8 weeks following embryo transfer. The pregnancy rate was affected by several factors, such as estrus induction, the number of previous transfer, transfer site, stage of CL (corpus luteum), the number of recipient CL, stage of embryos and the number of transferred embryo. The pregnancy rate was significantly higher in recipients that came into estrus naturally than recipients that induced to come into estrus with CIDR[®] (59.1% vs. 36.8%; $P<0.05$). The pregnancy rate was higher when the embryos were transferred into the left oviduct than transferred into the right oviduct (42.9% vs. 35.3%; $P<0.05$). The pregnancy rate of recipients with CH₁ (early) stage corpus hemorrhagicum in ovary was higher than recipient with CH₃ (late) stage hemorrhagicum (47.5% vs. 17.9%; $P<0.01$). Higher pregnancy rates were obtained by transfer of 1-cell stage embryos into oviduct while late blastocysts (51.6% vs. 66.7%; $P<0.01$) into uterus. The pregnancy rates when 3 embryos were transferred to recipients were significantly higher than when 2 embryos were transferred (47.6% vs. 27.0%; $P<0.05$). Although there were no significant difference among the group, adhesion of reproductive organs, uterine size, ovulation rate of recipients, presence of large follicle and difficulty of transfer affected pregnancy rate of recipient. Higher pregnancy rates were obtained in the recipients with 8~15 mm diameter uterine horn as compared to the recipients with <5 mm diameter or >20 mm diameter uterine horn (38.9%, 20% vs. 18.2%), in the recipients with large follicle in the ovulated ovary ipsilaterally (53.6% vs. 37.1%) and in the transfer which was carried out easily (39.2% vs. 27.8%, 0%).

In conclusion, the high rate of pregnancy was achieved following transfer of pronuclear microinjected embryos when three or four 1-cell stage embryos were transferred into oviduct with CH₁ stage corpus hemorrhagicum in the ovary of recipient which came into estrus naturally.

(Key words : embryo transfer, Korean black goats, laparoscopy, pregnancy)

서 론

염소와 면양에서의 수정란 이식은 Warwick과 Barry(1949)가 최초로 성공한 이래, 19개의 면양 수정란을 18마리의 수란양

에 이식하여 8마리의 새끼를 얻었다고 한 Hunter 등(1955)의 보고를 기점으로 본격적인 연구가 이루어졌다. 최근에는 대형 반추 동물에 비해 짧은 세대 간격을 가지고 있으며, 수술과 처

본 연구는 한미약품 연구센터의 지원에 의해 이루어진 것임.

¹ 한미약품 연구센터(Hanmi Research Center).

[†] Correspondence : E-mail : stshin@cnu.ac.kr

리가 용이하고 비용이 적게 드는 이점들 때문에 면양과 염소를 형질 전환 동물로 개발하려는 연구가 집중적으로 진행되어, Wright 등(1991)는 유선에서 human alpha-1-antitrypsin이 발현되는 형질 전환 면양을, Ebert 등(1991)은 유선에서 인간의 tissue-type plasminogen activator를 분비하는 형질 전환 염소를 생산을 보고하였다.

형질 전환 동물에 대한 활발한 연구에도 불구하고 아직까지 그 성공률이 매우 낮으며, 그 생산에는 고가의 비용이 소요된다(Wall 등, 1992). 따라서 수란 동물에 이식된 수정란의 수태율을 높이는 것이 많은 수의 형질 전환 동물을 생산하거나 생산 비용을 줄일 수 있는 중요한 요인이다. 효율적이고 높은 수태율을 얻고자 하는 노력의 일환으로 Hasler 등(1987)은 공란우, 수정란, 수란우의 상호 작용이 수태율에 미치는 영향에 관한 연구를 통해 수정란의 질, 수정란의 발육 단계, 수란우와 공란우의 동기화 등이 수태율에 영향을 준다고 발표하였고, Sreenan과 Diskin(1987)은 소에서 수정란 이식 후 수태율에 영향을 주는 요인들에 관한 여러 연구들을 검토하여 이식된 수정란 수와 질, 이식부위 등이 수태율에 영향을 미친다고 보고하였다. Armstrong 등(1983)은 수정란의 생존율은 수란염소의 배란율에 의해 영향을 받으며, 수정란을 1개나 3개 이식한 것보다 2개를 이식했을 때 더 생존율이 좋았다고 발표하였으며, Armstrong과 Evans(1983)는 면양에서는 수정란을 1개 이식할 경우와 2개 이식할 경우에 수정란의 생존율에 차이가 없으나, 염소에서는 2개 이식할 때 더 높은 생존율을 얻었다고 발표하였다. Tervit 등(1987; 1986)도 염소에서 수정란의 수와 이식부위에 따른 수정란의 생존율 차이를 보고하였다.

한국흑염소의 수정란의 이식에 관한 연구는 1980년대 말에서 1990년대 초까지 나 등(1987)과 Park 등(1991a; 1991b; 1991c; 1991d; 1989)에 의해 수행되어 왔으나, 이 연구들은 한국흑염소의 발정주기나 동기화, 수정란 채취와 이식에 관한 비교적 간단한 연구로써, 한국산 흑염소에서 대규모의 수정란 이식에 따른 결과나 이식 후 수태율에 영향을 주는 요인들에 대한 연구는 없었다. 전핵 미세 주입법(pronuclear microinjection, PI)한 형질 전환 양이나 염소의 이식에 영향을 주는 요인에 관한 연구는, PI를 이용하여 형질 전환 염소를 생산할 때 계절이 영향을 미치며, 수술횟수나 나이, 종 등은 수태율에 영향을 미치지 않는다고 한 Gootwine 등(1997)의 보고와, 염소에서 PI 가능한 수정란의 채취와 이식을 위해 과배란 처리 방법을 달리 하여 수란 염소의 배란과 수태 성적을 연구한 Selgrath 등(1990)의 보고밖에 없는 실정이다.

지난 수년간 본 연구팀에서는 한국흑염소에서 형질 전환 동물을 생산하기 위한 연구를 수행한 결과 PI 수정란의 이식을 통해 젓으로 human G-CSF(granulocyte colony stimulating factor)를 분비하는 흑염소를 생산하였다(Ko 등, 2000; Lee 등, 2000). 이를 수행하는 과정에서 본 연구는 1999년 9월에서

2000년 6월에 걸쳐 실시한 수술적 방법에 따른 PI한 한국흑염소 수정란의 이식 결과를 통해 수란 흑염소의 수태율에 영향을 미칠 것으로 생각되는 여러 가지 요인을 분석함으로써, 최대의 수태율을 얻을 수 있는 수란 흑염소의 최적 조건을 찾아 낼 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

본 연구에 사용된 동물은 전국의 여러 농장에서 구입하여 충남대학교 수의과대학에 설치된 사육사에서 사육된 체중 10 kg 이상, 10개월령 이상의 한국산 재래 흑염소 343마리였다. 모든 흑염소는 구입 후 임신 중절을 위해 PGF_{2α}(Pharmacia & Upjohn, Kalamazoo, MI)를 주사한 다음 2개월 이상 적응 기간을 거친 후 사용하였으며, 수술한 개체를 재사용할 경우에도 수술 후 2개월 이상의 회복기를 거친 후에 사용하였다.

2. 수란 흑염소의 발정 동기화

수란 흑염소의 발정 동기화를 위해 질내에 삽입하는 progesterone 제제인 CIDR[®] sheep and goat(InterAg, New Zealand)를 13일 동안 질내 삽입하였으며, CIDR[®]를 제거하기 48시간 전에 400 IU의 eCG(Pregnecol[®], Horizon Technology, Australia)를 투여하였다. CIDR[®] 제거 후 4일, 5일 및 9일에 수술하여 난소에 배란 후 생긴 출혈체 또는 황체가 존재하는 개체만을 수란 흑염소로 사용하였다.

3. 수정란

이식할 수정란은 기존의 본 연구팀에서 보고한 연구(Lee 등, 2000)와 같은 방법으로 CIDR[®] 제거 후 66시간 경에 공란 흑염소에서 채취한 1세포기배 중 전핵에 human G-CSF 유전자를 PI한 것으로 체외에서 2시간~2일 또는 5~6일 동안 배양하여 1~8세포기 또는 상실배~확장 배반포까지 발육시킨 수정란 중 이식에 적합한 good quality의 수정란을 선별하여 사용하였다.

4. 수정란 이식

수정란은 개복술에 의한 수술적 방법으로 이식하였다. 공란 흑염소의 발정일에 맞게 인공적으로 발정이 유지되었거나 자연발정이 온 수란 흑염소를 수술 전 2일간 절식시키고 하복부의 털을 깎은 뒤 2% xylazine(Rompun[®], Bayer, Korea) 0.35 mg/kg을 정맥 주사하여 진정시킨 후 양와 자세로 고정하였다. 수술을 용이하게 하기 위하여 내부 장기가 머리쪽으로 내려가도록 수술대를 후지가 높게 45° 정도 기울여 준비하고 수술전에 지속성 광범위 항생제인 PPS[®]((주)대성미생물연구소)를 3 ml 근육 주사하였다. Povidone iodine(10%)과 ethyl alcohol(70%)

로 수술 부위를 소독하고 유방의 끝부터 정중선을 따라 배꼽까지 2% lidocaine 8~10 ml를 피하에 투여하여 국소 마취시킨 후 하복부 정중선을 4~6 cm 정도 절개하였다. 절개 부위를 통해 생식기를 완전히 노출시킨 후에 자궁과 난소를 확인한 후 배란 여부와 출혈체 또는 황체의 발육단계를 검사하였다.

수정란은 실체 현미경으로 검경하여 수정란의 발육 단계와 질을 검사한 후에 micropipette이 장착된 1 ml 주사기에 미리 배양액을 0.2 ml 정도 흡입한 뒤 micropipette의 끝에 수정란을 loading하여 배란된 난소쪽의 난관 혹은 자궁에 이식하였다. 즉, 이식할 수정란의 발육단계가 1~8세포기의 경우에는 수란 흑염소의 난소에 corpus hemorrhagicum(CH)이 CH₁~CH₃로 존재하는지 확인한 후 난관채를 찾아 난관 복강구를 통해 micropipette에 미리 준비한 수정란을 주입하였다. 이식할 수정란의 발육 단계가 상실배 이상인 경우에는 수란 흑염소의 난소에 corpus luteum(CL)이 CL₃~CL₂로 존재하는지를 확인한 후, 같은 방법으로 준비한 수정란을 자궁각의 선단부에 작은 구멍을 뚫고 자궁강 내로 주입하였다. 주입 후에 micropipette에 배양액을 다시 흡입하고 dish에 배출하는 과정을 2~3회 반복하여 주입되지 않은 수정란의 유무를 확인하였다. 이식 후 난소와 자궁은 생리식염수로 세척하고 생식기를 다시 복강내로 복원한 뒤 100 ml의 생리식염수를 복강내에 주입한 후 복막, 피하직, 피부를 차례로 봉합하였다.

5. 임신 진단

수정란 이식 후 약 20~30일에 5 MHz 직장용 probe가 장착된 초음파 진단기(SA-600[®], Medison, Korea)를 사용하여 직장을 통해 1차 진단하였고, 이식 후 8주경에 직장 또는 복부를 통해 초음파 진단기로 2차 진단하여 임신 유무를 판정하였다.

6. 조사 대상 항목

- 1) 발정 형태 : 수란 흑염소의 발정 형태로써 유도 발정 또는 자연 발정
- 2) 수술 빈도 : 수정란 채취 또는 이식을 위한 개복 수술의 횟수
- 3) 유착 정도 : 생식기 주변의 유착 정도
 + : 10% 이하의 부위가 유착되었으며 얇은 피막의 형성
 ++ : 10~30% 부위가 유착되었으며 강한 피막 형성
 +++ : 50% 이상의 부위가 심하게 유착되었거나 피막에 현저한 혈관 분포가 있는 경우
- 4) 자궁각 크기 : 자궁각의 가장 굵은 부위의 직경
- 5) 이식 부위 : 배란된 난소와 동측의 난관 혹은 자궁에 이식
- 6) 황체의 발육 단계 : 황체의 발육 단계를 다음과 같이 구분
 OD(ovulation depression) : 배란점
 CH₁(corpus hemorrhagicum) : 배란 후 24시간 이내로 추

정되는 출혈체

CH₂ : 배란 후 48시간 전후로 추정되는 출혈체

CH₃ : 배란 후 3~4일경으로 추정되는 출혈체

CL₃(corpus luteum) : 크고 부드러운 활동성 황체

CL₂ : 작고 약간 단단한 황체

7) 황체의 수 : 배란되어 생긴 CH 또는 CL의 갯수

8) 대형 난포의 유무 : 직경 0.8 mm 이상의 대형 난포(large follicle, LF)의 존재 여부

9) 수정란 발육 단계; 1세포기배 ~ 확장 배반포

10) 수정란의 수; 이식 시 수란염소 한 마리당 주입되는 수정란의 수

11) 이식 난이도; 3단계로 나누어 평가

Easy : 수정란 주입시 아무런 문제가 없는 경우

Hard : 유착 등으로 인해 난관이나 자궁에 수정란을 주입하기가 까다로웠던 경우

Difficult : 부적절한 보정, 마취, 심한 유착 등으로 수정란의 주입이 매우 어려웠던 경우

7. 통계 처리

수정란 이식 후 수란 흑염소들은 발정 형태(자연 발정 혹은 유도 발정), 수술 빈도, 자궁, 난소, 난관의 유착 정도, 자궁각의 크기, 이식 부위, 황체의 발육 단계, 난소에 존재하는 황체의 수, 대형 난포의 유무, 수정란의 발육 단계, 이식된 수정란의 수, 이식 난이도에 따라 분류하고 각각의 수태 성적을 통계 프로그램인 SPSS를 사용하여 χ^2 를 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 발정 형태

Progesterone의 질내 삽입기구인 CIDR[®] sheep & goat를 2주간 질내 삽입하여 발정을 유도한 개체와 자연 발정이 일어난 개체에서의 수정란 이식 후 수태율은 각각 36.8%와 59.1%로써 자연발정에서의 수태율이 유도 발정에 비해 유의적으로 높았다($P < 0.05$, Table 1).

이러한 결과는 소에서 PGF_{2α}에 의해 발정 동기화시킨 개체와 자연발정이 온 개체간의 수정란 이식 후 수태율은 차이가 없었다고 한 Wright(1981)의 보고와, PGF_{2α}를 사용하여 발정을 유지한 경우(75%)에 자연 발정이 온 경우(68%)에서보다 오히려 높은 수태율을 얻었다고 한 Hasler 등(1987)의 보고와는 상반된 결과였다. 그러나 한국흑염소에서 synchro-mate B를 이용하여 유도 발정시킨 수란 흑염소 및 자연 발정 온 수란 흑염소에서의 수태율이 각각 25.7% 및 38.9% 였다는 이 등(1989)의 보고와 같은 경향을 나타내었으나 수태율은 훨씬 높았다. 따라서 수란 대상 흑염소가 충분히 준비될 수 있다면 자연 발정 온 개체를 수란 흑염소로 이용하는 것이 수태율을 향상시킬

수 있는 좋은 방안이 될 것이라 생각한다.

2. 수술 빈도

수란 흑염소가 수정란 이식수술에 사용된 횟수에 따른 수태율은 처음 수술 받을 때 36.5%, 두 번째 수술에서 56.5%, 세 번째 수술에서 100%였고(Table 2), 이중 통계적 비교가 가능한 두 번째 수술한 군의 수태율은 처음 수술 받는 군의 수태율보다 유의적으로 높았다($P<0.05$). 이러한 결과, 염소에서 이전의 이식 수술 횟수에 따른 수태율 차이는 없었다는 Gootwine 등(1997)의 보고나, 소에서 수란우로 사용된 횟수가 늘어날수록

수태율이 약간씩 저하되지만 유의적이 차이는 없었다는 Hasler 등(1987)의 보고와는 상반된 결과였다.

본 실험에서 2회 이상 수란염소로 사용한 경우, 개체의 전신적 건강 상태가 나쁘거나 개복 후 생식기 및 복강에 이상이 발견된 개체는 수란 대상 염소에서 제외시켰다. 따라서 상기의 보고와 상반된 본 실험의 결과는, 비록 2번째 및 3번째 수술 받은 군의 숫자가 적기는 하나, 첫 번째 수술 받은 수란 염소들에 비해 2번째 이상 수술 받은 수란 염소들은 체중이나 연령도 많을 뿐만 아니라 비교적 건강이 양호하였기 때문인 것으로 추측된다. 그러므로 개복술을 시행한다 하더라도 자궁 등 생식기에 큰 손상을 주지 않고 복강내 이상이 없는 한 수술 자체의 횟수는 수태율에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

Table 1. Effect of induction of estrus on pregnancy rates after transfer of microinjected embryos in Korean black goats

Treatment	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)
CIDR [®]	321	118	36.8 ^a
Natural	22	13	59.1 ^b
Total	343	131	38.2

^{ab} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 2. Effect of the number of previous transfers on pregnancy rates

No. of operation	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)
1	318	116	36.5 ^a
2	23	13	56.5 ^b
3	2	2	100.0 ^b
Total	343	131	38.2

^{ab} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 3. Effect of degree of adhesion on pregnancy rates

Adhesion score	Uterus		Oviduct		Ovary	
	No. of recipient	Pregnancy rate (%)	No. of recipient	Pregnancy rate (%)	No. of recipient	Pregnancy rate (%)
0	264	37.5	312	39.1	315	39.0
+	46	39.1	16	25.0	14	28.6
++	24	41.7	10	30.0	5	60.0
+++	6	50.0	5	40.0	9	11.1
Total	343	38.2	343	38.2	343	38.2

3. 유착 정도

자궁에서의 유착 정도에 따른 수태율은 유착이 없을 때 37.5%, (+)일 때 39.1%, (++)일 때 41.7% 및 (+++)일 때 50.0%로써 큰 차이가 없었고, 난관에서도 유착이 없을 때 39.1%, (+)일 때 25.0%, (++)일 때 30.0%, (+++)일 때 40.0%로 나타났다. 난소의 경우는 유착이 없을 때와 (+++)일 때 각각 39.1%와 11.1%로 수태율의 차이를 보였으나 자궁, 난관, 난소의 유착 모두 유의적인 차이를 보이지는 않았다(Table 3).

본 실험에서의 수란 염소들은 개복 후 생식기를 외부로 쉽게 노출시킬 수 있는 개체들이었다. 또한 자궁 및 난관의 유착이 (+++)로 판정된 개체라 할지라도 수정란의 이식이 곤란하거나 임신 후 자궁의 신장에 이상을 초래할 정도는 아니었다. 따라서 정상적인 수정란 이식만 이루어진다면 자궁과 난관, 난소에 일어난 어느 정도의 유착은 수태율에 아무런 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

4. 자궁각의 크기

자궁각의 크기에 따른 수태율에서는 5 mm 이하에서 20.0%, 8~15 mm에서 38.9% 및 20 mm 이상에서 18.2%로써 중간 크기의 자궁을 가진 흑염소에서 크거나 작은 자궁을 가진 염소에서보다 높은 수태율을 얻었다(Table 4).

Table 4. Effect of the maximum diameter of uterine horn on pregnancy rates

Uterus size	No. of recipient	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)
<5 mm	5	1	20.0
8~15 mm	314	122	38.9
>20 mm	11	2	18.2
Total	330	125	37.9

체중이나 자궁각의 크기가 반드시 나이와 비례한다고는 볼 수 없으나 어느 정도 상관관계가 있다. 자궁의 크기에 관련되어 수태율을 비교한 문헌은 찾을 수 없었으나, Wright(1981)는 18개월령 이상의 성우와 육성우에서 수태율이 각각 59% 및 58%로 차이가 없다고 보고하였고, 이 등(1989)은 비록 유의차는 없었으나 15개월령 이하의 육성우보다는 15개월령 이상의 육성우에서 더 양호한 수태율을 얻었다고 보고하였다. 본 실험에서 수란 흑염소는 체중 10 kg 이상, 10개월령 이상의 개체를 사용하는 것을 원칙으로 하였다. 그러나 연구기간 동안 많은 수의 흑염소를 사용하였으므로 흑염소의 수급 문제로 인하여 너무 어린 염소나 나이가 많은 흑염소가 일부 사용되었다. 따라서 자궁각이 작은 어린 염소들이나 자궁각이 큰 늙은 염소들에서는 수태율이 감소된 것으로 추측된다.

5. 이식 부위

이식 부위에 따른 수태율을 비교한 결과는 Table 5에서와 같다. 개복술 후 양쪽 난소를 확인하여 배란된 출혈체가 황체가 존재하는 쪽의 난관이나 자궁에 수정란을 이식하였으며, 양쪽 난소에서 배란이 일어난 경우에는 이식 부위를 임의로 정하였다. 1~8세포기배를 좌측 난관에 이식한 경우의 수태율은 49.0%로써 우측 난관에 이식했을 때(35.9%)보다 유의적으로 높은 수태율을 얻을 수 있었다($P<0.05$). 배란된 난소의 반대편 난관에 이식한 경우(ROd-L)나 반대편 자궁각에 이식한 경우(LU-R) 및 양쪽 난관에 각각 이식한 경우(ROd+LOd)에는 수태되지 않았다.

Tervit 등(1987)은 염소에서 한쪽에 배란된 경우 양쪽 중 어느 쪽에 이식하거나 양쪽 모두에 이식해도 영향이 없었다고 하였으나, Armstrong 등(1983)은 2개의 수정란을 양쪽에 각각 이식하는 것보다 한쪽에 이식할 경우 수정란의 생존율이 높았다고 보고하였다. 본 실험에서 자궁각의 좌측과 우측의 이식 후 수태율은 각각 31.4%와 34.5%로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 그러나 이 등(1989)은 소에서 좌측 자궁각에 이식한 경우의 수태율(65%)이 우측에 이식한 수태율(81.3%)보다 낮았다고 보고하였다.

6. 황체의 발육 단계

난소에 존재하는 황체의 발육 단계에 따른 이식 후 수태율은 Table 6에서와 같다. 즉, 1~8세포기배를 난관에 이식한 경우에는 수란 흑염소의 난소에 CH₁ 단계의 출혈체가 존재할 때 최대의 수태율을 얻을 수 있었으며, CH₃ 단계의 출혈체가 존재한 경우에서의 수태율보다 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P<0.01$).

상실배 이상의 수정란을 자궁각에 이식한 경우에는 수란 흑염소의 난소에 CL₃ 단계의 황체가 존재할 때 높은 수태율을 보였으나, CL₂ 단계의 황체를 가진 수란 흑염소는 한 마리도 임신되지 않았다. 이런 결과는 난관에 이식한 수정란의 대부분이 1세포기배이며 이에 맞는 발정 주기의 황체의 발육 단계는 CH₁이며, 자궁 이식한 상실배 이상의 수정란에 적합한 수란 흑염소의 황체의 발육 단계가 CL₃ 때문인 것으로 생각된다. 그러나, 본 실험과는 약간의 차이가 있으나, 소에서 황체를 normal, small, cystic의 3등급으로 나누어 연구한 Hasler 등(1987)은 황체의 등급에 따른 수태율의 차이는 없었다고 보고하였다.

7. 황체의 수

수란 흑염소의 난소에서 배란되어 발육된 황체가 1개 존재할 때의 수태율은 37.8%였으며, 2개 및 3개 이상인 경우의 수태율은 각각 40.7% 및 45.5%였으며, 이식한 수정란의 수가 증

Table 5. Effects of transfer site on pregnancy rates

Transfer site*	No. of recipients	No. of pregnant	Pregnancy rate (%)
ROd	128	46	35.9 ^a
ROd-L	1	0	0
LOd	102	50	49.0 ^b
ROd+LOd	4	0	0
RU	55	19	34.5 ^a
LU	51	16	31.4 ^a
LU-R	1	0	0
Total	342	131	38.3

^{ab} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

* ROd (ipsilateral transfer into right oviduct), ROd-L (contralateral transfer into left oviduct), LOd (ipsilateral transfer into left oviduct), ROd+LOd (transferred right and left oviduct), RU (ipsilateral transfer into right uterus), LU (ipsilateral transfer into left uterus) and LU-R (contralateral transfer into right uterus).

가할수록 수태율도 증가되었으나 유의차는 없었다(Table 7). Armstrong 등(1983)도 Angora 염소의 수정란 이식에서 황체의 수가 증가함에 따라서 수태율도 증가되었다고 보고하였다.

8. 대형 난포의 존재 유무

수란 흑염소의 난소에 직경 0.8 mm 이상의 대형 난포의 존재 여부에 따른 수태율은 대형 난포가 없거나 배란 황체가 있는 난소의 반대측 난소에 존재할 때 각각 37.1%와 33.3%였고, 배란 황체가 있는 난소와 같은 쪽 난소에만 존재할 때와 양쪽 난소에 동시에 존재할 경우 각각 53.6%와 50.0%로써, 수정란을 이식한 난관 또는 자궁과 같은 쪽의 난소에 대형난포가 존재하는 경우에 더 높은 수태율을 보였다(Table 8).

대형 난포의 존재 유무가 수태율에 영향을 미치는 원인에 대한 정확한 이유를 알 수는 없으나, 황체의 숫자가 많을수록 수태율이 높아졌다는 Armstrong 등(1983)의 연구 결과를 유추하여 볼 때, 대형 난포가 차후 배란 또는 황체화 되면서 수태율에 영향을 준 것으로 추측된다. 그러나, 수태율에 대한 유의차는 없었으므로, 이에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다고

Table 6. Effect of stage of corpus luteum on pregnancy rates

Transfer site	Stage of CL	No. of recipients	No. of pregnancies	Total
Oviduct	OD	22	9 (40.9) ^{ab}	39.9
	CH ₁	120	57 (47.5) ^{ab}	
	CH ₂	62	24 (38.7) ^{ab}	
	CH ₃	39	7 (17.9) ^b	
Uterus	CL ₃	92	32 (34.8)	34.0
	CL ₂	2	0 (0)	
Total		337	129 (38.3)	

^{ab} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

OD; ovulation point, CH; corpus hemorrhagicum, CL; corpus luteum.

Table 7. Effect of ovulation rate of recipients on pregnancy rates

No. of CL	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)	
1	299	113	37.8	
2	27	11	40.7	
>3	11	5	45.5	
Total		337	129	38.3

생각된다.

9. 수정란의 발육 단계

수정란의 발육단계에 따른 수태율은, 난관에 이식했을 경우에는 1세포기배일 때 가장 높은 수태율인 51.6%로써 4세포기배를 이식했을 때(24.5%)보다 유의적으로 높은 결과를 나타내었다($P < 0.01$, Table 9). 한편, Armstrong 등(1983)은 1~4세포기배 및 5~8세포기배를 채란 후 바로 이식하였을 때 수정란의 생존율은 각각 50% 및 69%로써 5~8세포기배에서의 수정란의 생존율이 높았다고 보고하였다. 본 실험의 결과가 Armstrong 등(1983)의 보고와 상반된 까닭은, 본 실험에서의 4~8세포기배는 채란 및 PI 후 1일 이상 체외 배양한 다음 이식하였으므로, 서로의 실험 조건이 달라서 생긴 차이라고 생각된다.

수정란을 자궁에 이식했을 경우에는, 중기 배반포(MB)와 후기 배반포(LB)가 각각 50.0%와 66.7%로 가장 높은 수태율을 보였고, 확장 배반포(ExB)와 부화 배반포(HB)에서 각각 18.2%와 20.0%로 가장 낮은 수태율을 보였다(Table 10). 이러한 결과는 소에서 상실배(71%), 확장 배반포(70%), 부화 배반포(66%)를 이식했을 때보다 초기 배반포(EB, 77%)와 중기 배반포(75

Table 8. Effect of presence of large follicle (LF) on pregnancy rates

Site of LF	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)	
None	280	104	37.1	
Ipsilateral	28	15	53.6	
Contralateral	27	9	33.3	
Both	2	1	50.0	
Total		337	129	38.3

Table 9. Effect of embryonic development on the pregnancy rates in tubal transfer

Stage of embryos	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)	
1-cell	95	49	51.6 ^a	
2-cell	7	1	14.3 ^b	
4-cell	49	12	24.5 ^b	
8-cell	8	1	12.5 ^b	
Total		159	63	39.6

^{ab} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

%)를 이식했을 때 더 높은 수태율을 보였다는 Hasler 등(1987)의 보고와 초기 상실배의 이식(61%)보다는 초기 배반포(67%)와 후기 배반포(71%)를 이식한 경우의 수태율이 유의적으로 높았다는 Schneider 등(1980)의 보고와 유사한 결과이다. 그러나, Wright(1981)와 이 등(1989)은 확장 배반포를 이식했을 때의 수태율도 중기 배반포를 이식했을 때와 같이 높은 수태율을 얻었다고 하였으나, 본 실험에서는 확장 배반포를 이식했을 때는 오히려 수태율이 저하되는 경향을 나타내었다.

10. 이식된 수정란의 수

수란 흑염소에 한번에 주입하는 수정란의 수에 따른 수태율은 Table 11에서와 같다. 즉, 이식하는 수정란의 개수가 많아질수록 수태율도 높아지는 경향을 나타냈으며, 한꺼번에 3개의 수정란을 이식했을 때의 수태율(47.6%)이 2개를 이식했을 때의 수태율(27.0%)보다 유의적으로 높았다($P<0.01$). 이러한 결과는 염소와 양에서 1개의 수정란을 이식했을 때(51.6%) 보다는 2개를 이식했을 때(65.2%) 수정란의 생존율이 높았다고 한 Armstrong과 Evans(1983)의 보고와 같은 경향이었다. 그러

Table 10. Effect of embryonic development on the pregnancy rates in uterine transfer

Stage of embryos	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)
Morula	34	10	29.4
EB	20	7	35.0
MB	4	2	50.0
LB	6	4	66.7
EXB	11	2	18.2
HB	15	3	20.0
Total	90	28	31.1

EB; early blastocyst, MB; mid blastocyst, LB; late blastocyst, ExB; expanded blastocyst, HB; hatched blastocyst.

Table 11. Effect of the number of embryos on pregnancy rates

No. of embryos/recipient	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)
2	137	37	27.0 ^a
3	105	50	47.6 ^b
Total	242	87	36.0

^{ab} Pregnancy rates with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Table 12. Effect of difficulty of transfer on pregnancy rates

Difficulty of transfer	No. of recipients	No. of pregnancies	Pregnancy rate (%)
Easy	319	125	39.2
Hard	18	5	27.8
Difficult	3	0	0
Total	340	130	38.2

나 Gootwine 등(1997)은 이식된 수정란의 수는 수란염소의 수태율에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

11. 이식의 난이도

수정란을 시행하는 과정에서 수란 흑염소의 적절치 못한 보정이나 마취, 생식기의 유착 등은 수정란을 난관이나 자궁에 주입할 때 여러 가지 문제를 야기시킨다. 수정란 주입시의 난이도를 3단계로 나누어 수태율을 조사한 결과는 Table 12에서와 같다. 즉, 이식이 쉽게 이루어진 경우에서의 수태율이, 이식이 어렵거나 매우 곤란한 경우에서의 수태율보다 높았다. 따라서, 충분한 보정 및 마취를 실시하여 수정란 이식시에 수란 흑염소가 갑작스럽게 움직이는 경우가 발생하지 않도록 주의해야 하며, 수정란 주입 전에 이식관이 난관이나 자궁강 내에 정확히 삽입되어 있는지를 확인하는 것이 중요하다고 생각된다.

적 요

본 연구는 PI한 한국흑염소 수정란의 이식 결과를 통해 수란 흑염소의 수태율에 영향을 미칠 것으로 생각되는 여러 가지 요인을 분석함으로써, 높은 수태율을 얻을 수 있는 수란 흑염소의 최적 조건을 찾아낼 목적으로 수행하였다.

분석 결과, 수태율에 유의적인 영향을 주는 요인들은 발정 형태, 수술 빈도, 이식 부위, 황체의 발육 단계, 수정란의 발육 단계, 이식된 수정란의 수 등이었다. 자연 발정이 관찰되어 이식된 흑염소(59.1%, 13/22)들이 CIDR[®]로 발정이 유도된 후 이식된 흑염소(36.8%, 118/321)에서보다 높은 수태율을 나타내었으며($P<0.05$), 두 번째 수술 받은 흑염소의 수태율(56.5%, 13/23)이 처음 이식 받은 흑염소(36.5%, 116/318)에 비해 수태율이 높았다($P<0.05$). 이식한 부위에 따른 수태율은 좌측 난관에 이식한 흑염소(49.0%, 50/102)가 오른쪽 난관에 이식한 흑염소(35.9%, 46/128)에 비해 수태율이 더 높게 나타났으며($P<0.05$), 황체의 발육 단계에 따른 수태율에서는 CH₁ 단계(47.5%, 57/120) 출혈체를 가진 수란 흑염소에서 CH₃(17.9%, 7/39)의 출혈체를 가진 수란 흑염소보다 높은 수태율을 얻었다($P<0.01$). 수

정란의 발육단계에 따른 차이는 난관 이식의 경우에 1세포기배가 이식된 수란 흑염소의 수태율(51.6%, 49/95)이 4세포기배를 이식한 경우(24.5%, 12/49)보다 높았다($P<0.01$). 수정란의 수는 2개를 이식했을 때(27%, 37/137)보다 3개를 이식했을 때(47.6%, 50/105) 더 높은 수태율을 얻었다($P<0.01$).

수태율에 유의적인 영향이 없는 요인들은 난관 유착이나 자궁 유착, 난소 유착, 자궁각의 크기, 황체의 수, 대형 난포의 존재 유무, 이식의 난이도 등이었다. 그러나, 중간 크기의 자궁을 가진 수란 흑염소(38.9%, 122/314)에서 직경 5 mm 이하의 작은 자궁을 가진 수란 흑염소(20%, 1/5)나 20 mm 이상의 큰 자궁을 가진 수란 흑염소(18.2%, 2/11)보다 수태율이 높은 경향을 보였고, 배란 황체가 있는 같은쪽 난소에 대형 난포가 존재할 경우(53.3%, 16/30)에 존재하지 않는 경우(37.1%, 104/280)보다 수태율이 높아지는 경향을 보였으며, 이식이 쉽게 이루어진 경우(39.2%, 125/319)에 이식이 어렵거나(27.8%, 5/18) 곤란한 경우(0%, 0/3)에서보다 높은 수태율을 얻을 수 있었다. 따라서, 자궁각의 크기나 대형 난포의 존재 유무, 이식의 난이도 등도 수정란 이식 후의 수태율에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때 PI한 한국 흑염소 수정란의 이식 시 높은 수태율을 얻기 위해서는 수란 흑염소는 자연 발정 온 개체를 이용하고, 난관에 이식하고자하는 경우에는 난소에 CH₁ 단계의 출혈체가 존재하는 쪽 난관에 1세포기의 수정란을, 그리고 자궁에 이식하는 경우에는 난소에 발육 단계가 CL₃인 황체가 존재하는 쪽 자궁각에 중기 배반포나 후기 배반포를 이식하는 것이 가장 바람직하다는 결론을 얻었다.

참고문헌

- Armstrong DT and Evans G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 19:31-42.
- Armstrong DT, Pfizner AP, Warnes GM and Seamark RF. 1983. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *J. Reprod. Fert.*, 67:403-410.
- Ebert KM, Selgrath JP, DiTullio P, Denman J, Smith TE, Memon MA, Schindler JE, Monastersky GM, Vitale JA and Gordon K. 1991. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk : generation of transgenic goats and analysis of Expression. *Biotechnology*, 9:835-838.
- Gootwine E, Barash I, Bor A, Dekel I, Friedler A, Heller M, Zaharoni U, Zunue A and Shani M. 1997. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology*, 48:485-499.
- Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF and Foote RH. 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27:139-168.
- Hunter GL, Adams CE and Rowson LE. 1955. Inter-bred ovum transfer in sheep. *J. Agric. Sci. (Camb.)*, 46:143-149.
- Ko JH, Lee CS, Kim KH, Pang MG, Koo JS, Fang N, Koo DB, Oh KB, Youn WS, Zheng GD, Park JS, Kim SJ, Han YM, Choi IY, Lim J, Shin ST, Jin SW, Lee KK and Yoo OJ. 2000. Production of biologically active human granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic Res.*, 9:215-222.
- Lee CS, Fang NZ, Koo DB, Lee YS, Zheng GD, Oh KB, Youn WS, Han YM, Kim SJ, Lim JH, Shin ST, Jin SW, Lee KS, Ko JH, Koo JS, Park CS, Lee KS, Yoo OJ and Lee KK. 2000. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goats from Korean native strain, *Capra hircus aegagrus*. *Small Ruminant Research*, 37:57-63.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and Lee JS. 1989. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats: I. Estrus induction and synchronization in goats. *Korean J. Anim. Sci.*, 31:8-14.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and Lee JS. 1991. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats: II. Short estrus cycle following parturition or abortion in goats. *Korean J. Anim. Sci.*, 33:281-287.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and Lee JS. 1991. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats: III. Induction of superovulation with PMSG or FSH in goats. *Korean J. Anim. Sci.*, 33:288-293.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and Lee JS. 1991. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats: IV. Production of monozygotic twins by bisection of mouse and goat embryos. *Korean J. Anim. Sci.*, 33:294-301.
- Park CS, Choe SY, Lee HJ and Lee JS. 1991. Studies on the technological development of embryo transfer and manipulation in goats: V. Improvement of viability and conception rate following bisection and transfer of mouse and goat embryos. *Korean J. Anim. Sci.*, 33:342-347.
- Schneider HJ Jr, Castleberry RS and Griffin JL. 1980. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 13:73-85.
- Selgrath JP, Memon MA, Smith TE and Ebert KM. 1990. Collection and transfer of microinjectable embryos from dairy goats. *Theriogenology*, 34:1195-1205.
- Sreenan JM and Diskin MG. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology*, 27:99-113.

- Tervit HR, Gold PG and McKenzie RD. 1986. Development of an effective goat embryo transfer regime. Proc. NZ. Soc. Anim. Prod., 46:233-236.
- Tervit HR. 1987. Factors affecting the success of goat embryo transfers. Proc 4th AAAP. Anim. Sci. Congr., pp. 262-266.
- Wall RJ, Hawk HW and Nel N. 1992. Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. J. Cell Biochem., 49:113-120.
- Warwick BL and Barry RO. 1949. Inter-generic and Intra-specific embryo transfer in sheep and goats. J. Hered., 40:297-303.
- Wright G, Carver A, Cottom D, Reeves D, Scott A, Simons P, Wilmut I, Garner I and Colman A. 1991. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. Biotechnology, 9:830-840.
- Wright JM. 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle: embryo-recipient interactions. Theriogenology, 15:43-56.
- 나진수, 김용식, 강병규. 1987. 재래산양의 수정란이식. 한국축산학회지, 29:295-302.
- 이정호, 박항균, 신상태. 1989. 소 수정란이식에 있어서 수란우와 수정란의 조건이 수태율에 미치는 영향. 대한수의학회지, 29:61-68.

(접수일: 2007. 3. 9 / 채택일: 2007. 3. 21)